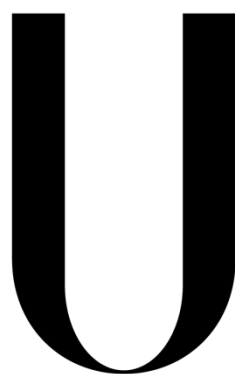


Universidade de Lisboa
Faculdade de Medicina Dentária



LISBOA

UNIVERSIDADE
DE LISBOA

**Estudo *in vitro* sobre a influência do tempo de aplicação na
técnica de *Ethanol-wet Bonding***

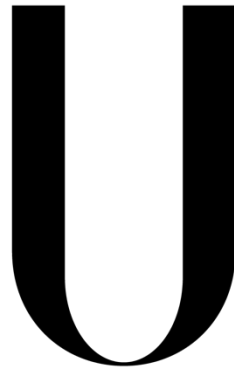
Rui Pedro Correia Fabiano

Dissertação

Mestrado Integrado em Medicina Dentária

2016

Universidade de Lisboa
Faculdade de Medicina Dentária



LISBOA

UNIVERSIDADE
DE LISBOA

**Estudo *in vitro* sobre a influência do tempo de aplicação na
técnica de *Ethanol-wet Bonding***

Rui Pedro Correia Fabiano

Dissertação orientada pela Dra. Ana Pequeno

Mestrado Integrado em Medicina Dentária

2016

MURPH

I know. People didn't believe me, they
thought that I was doing it all myself.

But... (Taps watch.)

I knew who it was. Nobody believed me,
but I knew you'd come back.

COOPER

How?

MURPH

Because my dad promised me.

– *Interstellar*, Jonathan Nolan e Christopher Nolan –

Agradecimentos

À minha orientadora, a Dra. Ana Pequeno, pela disponibilidade e apoio em todos os passos da concretização deste estudo e desta dissertação. Acima de tudo, o meu agradecimento pelo conhecimento comigo partilhado.

À Dra. Filipa Chasqueira, por toda a disposição e simpatia, que tornaram a introdução ao laboratório mais agradável.

Ao Professor Dr. Jaime Portugal e à Professora Dra. Sofia Arantes e Oliveira pela ajuda prestada.

Ao Professor Dr. Luís Pires Lopes pela disponibilização das instalações e materiais do Laboratório de Biomateriais da Faculdade de Medicina Dentária da Universidade de Lisboa.

Aos meus amigos Joana Condeço e David Pereira, por tudo.

Aos meus colegas e amigos Fábria Alexandre, Pedro Padilha, Margarida Pereira, Ana Catarina Anastácio e Filipa Rodrigues, pelos sorrisos constantes que tornaram esta jornada bem melhor.

Às minhas colegas Sara Ribeiro, Maria Rolão e Carolina Carvalho pelas horas de boa disposição no laboratório.

À minha família, em especial aos meus pais e irmãos, pela possibilidade e pela motivação.

A todos, o meu obrigado.

Índice

I. Resumo	vii
I. Abstract	viii
II. Introdução	1
1. A técnica de <i>Water-wet Bonding</i> e os seus desafios	1
2. A técnica de <i>Ethanol-wet Bonding</i>	3
3. Os testes de microtração	6
4. Objetivos	7
III. Materiais e Métodos	8
1. Tipo de estudo	8
2. Desenho do estudo	8
3. Preparação dos espécimes e procedimentos adesivos e restauradores.....	8
4. Preparação para os testes de microtração.....	16
5. Testes de microtração.....	18
6. Análise estatística.....	19
IV. Resultados	20
V. Discussão	23
VI. Conclusões	28
Anexo 1.....	I
Bibliografia	II

Lista de tabelas, gráficos e figuras

Tabela 1 – Produtos utilizados no estudo, e respectivos fabricantes, lotes, composições e validades	15
Tabela 2 – Caracterização dos palitos obtidos, por grupo e por dente.....	17
Tabela 3 – Quantidade dos vários tipos de fraturas obtidas em cada grupo	20
Tabela 4 – Teste de normalidade de Shapiro-Wilk.....	21
Tabela 5 – Teste de homogeneidade da variância de Levène	21
Tabela 6 – Médias e desvio padrão das forças de microtração (MPa), por grupo	22
Tabela 7 – Protocolo adesivo do Grupo 1	I
Tabela 8 – Protocolo adesivo dos Grupos 2 e 3	I
Gráfico 1 – Percentagem dos vários tipos de fratura no total de todos os grupos	20
Gráfico 2 – Médias das forças de microtração (MPa), por grupo.....	22
Fig. 1 – Dente montado num suporte de acrílico com cera colante.....	8
Fig. 2 e 3 – Corte das raízes num micrótomo, cerca de 2 mm abaixo da junção amelocementária, com exposição da câmara pulpar	9
Fig. 4 – Remoção dos restos pulpares	9
Fig. 5 – Preenchimento da câmara pulpar com cola de cianoacrilato	9
Fig. 6 – Fixação do remanescente dentário ao suporte acrílico, com cola de cianoacrilato	10
Fig. 7 e 8 – Corte do esmalte e dentina superficial com disco diamantado para exposição da dentina média	10
Fig. 9 – Máquina polidora	11

Fig. 10 – Normalização da <i>smear layer</i> com disco de papel SiC de grão 600	11
Fig. 11 – Condicionamento ácido da amostra	11
Fig. 12 – Dentina húmida, após lavagem do ácido ortofosfórico	11
Fig. 13 – Secagem do <i>primer</i> após a sua aplicação com <i>micro-brush</i>	12
Fig. 14 – Aplicação do adesivo.....	12
Fig. 15 – Aplicação de etanol com <i>micro-brush</i>	13
Fig. 16 – Pipetagem de uma gota de etanol	13
Fig. 17 – Aplicação de uma gota de adesivo para mistura com a gota de etanol a 96%	13
Fig. 18 – Aplicação do <i>primer</i> experimental	14
Fig. 19 – Fotopolimerização do adesivo	14
Fig. 20 – Restauração por incrementos.....	14
Fig. 21 – Reconstrução com cerca de 6 mm de altura pintada com tinta resistente a água	15
Fig. 22 – Armazenamento das amostras na estufa.....	15
Fig. 23 – Corte do espécime no eixo do x.....	16
Fig. 24 – Espécime cortado nos eixos do x e do y	16
Fig. 25 – Corte para separar os palitos do suporte de acrílico	16
Fig. 26 – Palitos obtidos após o corte	16
Fig. 27 – Palito colado a um <i>jig</i> de Geraldelli	18
Fig. 28 – Palito colado a um <i>jig</i> de Geraldelli, durante o teste de microtração	18
Fig. 29 – Medição da secção de um palito fraturado com craveira	19
Fig. 30 – Registo da secção, da força em KiloNewtons e do tipo de fratura.....	19

Lista de abreviaturas

Bis-GMA	bisfenol glicidil metacrilato
EWB	<i>Ethanol-wet Bonding</i>
EWBp	protocolo progressivo de <i>Ethanol-wet Bonding</i>
EWBs	protocolo simplificado de <i>Ethanol-wet Bonding</i>
HEMA	hidroxietilmetacrilato
WWB	<i>Water-wet Bonding</i>
μSBS	microcissalhamento
μTBS	microtração

I. Resumo

Objetivos: avaliar a influência da técnica simplificada de *Ethanol-wet Bonding* com etanol a 96% comparativamente com a técnica *Water-wet Bonding* nos testes de microtração às 24 horas; comparar a influência de dois tempos de aplicação de etanol a 96% (30 e 60 segundos) através da técnica simplificada de *Ethanol-wet Bonding* na resistência a microtração às 24 horas.

Materiais e métodos: superfícies de dentina média de 15 porções de dentes humanos visivelmente livres de cárie foram divididas aleatoriamente pelos três grupos e condicionadas com ácido fosfórico a 35%. No grupo 1 aplicou-se a técnica de *Water-wet Bonding* com o sistema adesivo Adper Scotchbond® Multi-purpose (3M), e nos grupos 2 e 3 a técnica simplificada de *Ethanol-wet Bonding*, com etanol a 96%, durante 30 e 60 segundos, respetivamente, *primer* experimental hidrofóbico e o adesivo do sistema adesivo Adper Scotchbond® Multi-purpose (3M). Realizaram-se testes de microtração 24 horas depois. Os dados foram analisados com Oneway ANOVA.

Resultados: não existem diferenças estatisticamente significativas entre os três grupos. O grupo 3, com técnica simplificada de *Ethanol-wet Bonding*, com etanol a 96% durante 60 segundos apresentou valores de MPa médios superiores.

Conclusões: a aplicação de um novo protocolo simplificado da técnica de *Ethanol-wet Bonding*, com aplicações de etanol a 96% durante 30 ou 60 segundos, recorrendo a materiais acessíveis e económicos e com um dispêndio de tempo clinicamente aceitável, não apresenta diferenças estatisticamente significativas quando comparado com a aplicação da técnica de *Water-wet Bonding* com o *gold standard* da adesão, o Adper Scotchbond® Multi-purpose.

Palavras-chave: *Ethanol-wet bonding*, *water-wet bonding*, força de adesão

I. Abstract

Objectives: to evaluate the influence of the simplified protocol of the Ethanol-wet Bonding technique, with 96% ethanol, compared to the Water-wet Bonding technique through microtensile tests at 24 hours; to compare the influence of two 96% ethanol application times (30 and 60 seconds) on the simplified protocol of the Ethanol-wet Bonding technique, through microtensile tests at 24 hours.

Materials and methods: middle dentin surfaces from 15 human teeth visibly free of caries were randomly divided by three groups and conditioned with 37% phosphoric acid. In group 1, Water-wet Bonding technique was applied with Adper Scotchbond® Multi-purpose (3M) adhesive system; in groups 2 and 3, simplified protocol of the Ethanol-wet Bonding technique was applied, with 96% ethanol for 30 and 60 seconds, respectively, experimental hydrophobic primer and adhesive from the Adper Scotchbond® Multi-purpose (3M) adhesive system. Microtensile tests were performed 24 hours later. Data was analysed with Oneway ANOVA.

Results: no significant differences between the three groups were found. Group 3, in which the simplified protocol of the Ethanol-wet Bonding technique was applied, with 96% ethanol for 60 seconds showed the greater medium MPa value.

Conclusions: the application of a new protocol of the simplified Ethanol-wet Bonding technique, with the applications of 96% ethanol for 30 or 60 seconds, using accessible and economic materials and with a clinically reasonable time cost, did not show statistically significant differences compared to the application of the Water-wet Bonding technique with the gold standard of adhesion, Adper Scotchbond® Multi-purpose.

Key words: Ethanol-wet Bonding, Water-wet Bonding, bond strength

II. Introdução

1. A técnica de *Water-wet Bonding* e os seus desafios

As últimas duas décadas presenciaram um aumento de popularidade de restaurações estéticas (Khoroushi *et al.*, 2014), tendo sido notória e constante a evolução dos sistemas adesivos necessários à adesão dessas mesmas restaurações às peças dentárias (Breschi *et al.*, 2008; Huang *et al.*, 2011; Liu *et al.*, 2011). Essa adesão é profundamente influenciada pelo tipo de substrato ao qual é feita, não sendo igual nos diversos tecidos que constituem o dente. Hoje aceita-se que a adesão à dentina é mais complexa que a adesão ao esmalte, dada a sua natureza mais orgânica e rica em água (Ekambaram *et al.*, 2014; Sezinando, 2014; Li *et al.*, 2015). Até aos nossos dias a adesão dentinária continua a enfrentar desafios a longo prazo (Ayar, 2016), verificando-se inevitavelmente uma deterioração da adesão dentinária ao longo do tempo, com perdas de força de adesão de 30-40% logo após 3-6 meses *in vitro* (Hosaka *et al.*, 2009). Esta deterioração da adesão dentinária é atribuída quer à degradação da resina adesiva, quer do colagénio, ou ambos (Ekambaram *et al.*, 2014).

A aplicação da técnica adesiva *Water-wet Bonding* (WWB) depende da forma como o sistema adesivo interage com a *smear layer*, dissolvendo-a ou tornando-a permeável (Sezinando, 2014). Deste modo, a técnica WWB pode ser aplicada com dois tipos de adesivos. O primeiro, os sistemas *etch-and-rinse*, pressupõe a aplicação de um ácido para condicionamento do esmalte e dentina e dissolução da *smear layer*, sendo posteriormente lavado (Pashley *et al.*, 2011). O segundo tipo, os sistemas *self-etch*, é constituído por monómeros acídicos que condicionam e infiltram a *smear layer* e a rede de colagénio dentinário simultaneamente, sendo posteriormente feita a sua secagem (Van Meerbeek *et al.*, 2011). Esta técnica de WWB, em geral, tem como objetivo evitar o colapso da rede de colagénio após o condicionamento ácido da dentina, permitindo a sua incorporação na camada híbrida. Contudo, a técnica WWB continua a enfrentar alguns desafios.

A água é essencial para a estabilidade das proteínas, incluindo o colagénio. Cerca de 21-25% da massa de água presente na dentina desmineralizada é considerada como pertencente à estrutura dentinária, não se comportando como os restantes 75-79%, considerada água livre (Agee *et al.*, 2015). Esta água estrutural não pode ser evaporada à temperatura corporal e a pressão atmosférica comum, e permanecerá na dentina após os

procedimentos adesivos (Chiba *et al.*, 2016). A chave para a criação de uma adesão dentinária ideal poderia passar pela substituição dos restantes 75-79% de água considerada livre por solventes miscíveis em água (como, por exemplo, o etanol), devendo ser simultaneamente bons solventes dos monómeros de resina (Chiba *et al.*, 2016). Na prática clínica, é extremamente difícil a remoção total dos 75-79% de água livre. Na verdade, vários autores concluíram que os adesivos dentários atuais não têm capacidade de substituir água livre (Mortazavi *et al.*, 2012). O excesso de água remanescente causa frequentemente uma polimerização incompleta dos monómeros de resina adesiva. Este excesso não é um meio solvente ideal para monómeros mais hidrofóbicos, provocando não só a sua separação de fases a nível macroscópico, como também alterações a nível nanoscópico (Agee *et al.*, 2015; Ayar, 2016). Desta forma, e uma vez que o substrato dentário é mantido húmido no processo da adesão, ao longo do tempo verificou-se uma necessidade de aumentar a concentração de monómeros com porções hidrofílicas aos sistemas adesivos, como o hidroxietilmetacrilato (HEMA), reduzindo-se a concentração de monómeros mais hidrofóbicos, como o bisfenol glicidil metacrilato (Bis-GMA) (Liu *et al.*, 2011; Ekambaram *et al.*, 2014; Khun *et al.*, 2015). Contudo, hoje sabe-se que esses monómeros mais hidrofílicos são responsáveis por uma absorção de água superior, após a sua polimerização (Yiu *et al.*, 2004; Malacarne *et al.*, 2006; Sadek *et al.*, 2008; Mortazavi *et al.*, 2012; Araújo *et al.*, 2013), provocando uma plastificação das cadeias de resina (Hosaka *et al.*, 2009) e reduzindo, por isso, as forças de adesão ao longo do tempo (Ito *et al.*, 2005; Ekambaram *et al.*, 2014).

Outro grande desafio da adesão dentinária prende-se com a degradação do colagénio, realizada por enzimas endógenas, como as metaloproteinases da matriz (MMP) -1, -2, -3, -8 e -9 e catepsinas (Ekambaram *et al.*, 2014; Li *et al.*, 2015). As MMP são um grupo de endopeptidases, cálcio e zinco-dependentes, presas na matriz dentinária mineralizada durante o desenvolvimento dentário, sendo ativadas pelo condicionamento ácido inerente a todos os sistemas adesivos dentários *etch-and-rinse* (Agee *et al.*, 2015). Para que entrem em atividade, estas enzimas necessitam de meio aquoso. As catepsinas são proteases endógenas com papel ativo na degradação de matriz extracelular, destacando-se a catepsina K (Jee *et al.*, 2016) e catepsina B, presente tanto na polpa dentária, como nas lesões de cárie e nos odontoblastos (Ekambaram *et al.*, 2014). Nos adesivos atuais, parece ocorrer uma evaporação incompleta do solvente e uma infiltração deficiente e parcial de monómeros de resina em todos os sistemas (Liu *et al.*, 2011;

Khoroushi *et al.*, 2014; Grégoire *et al.*, 2013). Por estas razões, permanecem espaços interfibrilares na rede de colagénio preenchidos com água e fibras de colagénio hidratadas não envolvidas por resina (Hosaka *et al.*, 2009; Liu *et al.*, 2011). Deste modo, estabelece-se uma das condições necessárias para a atividade das enzimas endógenas anteriormente referidas, as quais provocam a degradação das fibras de colagénio não envolvidas por resina, afetando a estabilidade da adesão (Faria-e-Silva *et al.*, 2013).

2. A técnica de *Ethanol-wet Bonding*

Com o objetivo de colmatar as falhas da técnica adesiva WWB, foi recentemente introduzido o conceito de *Ethanol-wet Bonding* (EWB). Este conceito utiliza o etanol, um solvente polar com menor capacidade de estabelecer ligações de hidrogénio (Kim *et al.*, 2010), para desidratar quimicamente a rede de colagénio dentinário exposta após o condicionamento ácido, tornando-a teoricamente menos hidrofílica (Huang *et al.*, 2011; Khoroushi *et al.*, 2014; Shin *et al.*, 2009; Yesilyurt *et al.*, 2015), com redução do tamanho das fibras de colagénio e maiores espaços inter e intrafibrilares (Hosaka *et al.*, 2009; Perdigão *et al.*, 2013; Mortazavi *et al.*, 2012). O etanol funciona como um meio físico de suspensão que evita o colapso da rede de colagénio (Sadek *et al.*, 2010; Pei *et al.*, 2012). Embora se verifique uma pequena contração da rede de colagénio (18%) após a aplicação de etanol num substrato dentinário desmineralizado e com água (Pashley *et al.*, 2007), o uso de etanol para saturação de dentina facilita a infiltração de resinas mais hidrofóbicas (Huang *et al.*, 2011; Khoroushi *et al.*, 2014; Ayar *et al.*, 2014; Perdigão *et al.*, 2013; Ahn *et al.*, 2015), evitando a separação de fases (Huang *et al.*, 2011; Shin *et al.*, 2009; Sadek *et al.*, 2010; Araújo *et al.*, 2013), com maior incorporação e proteção do colagénio no sistema adesivo (Khoroushi *et al.*, 2014; Yesilyurt *et al.*, 2015; Araújo *et al.*, 2013). Reduz também o efeito de plastificação, uma vez que diminui a absorção de água a longo prazo pelos monómeros mais hidrofílicos (Huang *et al.*, 2011; Liu *et al.*, 2011; Manso *et al.*, 2014; Perdigão *et al.*, 2013).

Vários autores reportam, após testes *in vitro*, que através da técnica de EWB é possível conseguir forças de adesão comparáveis às dos adesivos hidrofílicos atuais (Tay *et al.*, 2007; Sadek *et al.*, 2008; Hosaka *et al.*, 2009). Scheffel e seus colegas concluíram que a aplicação da técnica de EWB provoca inflamação pulpar comparável à provocada pela técnica WWB (Scheffel *et al.*, 2015). Há ainda autores, como Sauro e seus colaboradores, que defendem que a técnica é aplicada com maior sucesso clinicamente,

em comparação com a técnica de WWB, uma vez que é possível aplicar qualquer adesivo a um substrato na condição de *overwet* em etanol sem alterar a qualidade da camada híbrida (Sauro *et al.*, 2010).

Distinguem-se duas formas de aplicação da técnica de EWB. A primeira técnica descrita é a progressiva (EWBp), sendo executada com concentrações crescentes de etanol. A segunda técnica descrita denomina-se simplificada (EWBs), e nesta é feita uma saturação da dentina com etanol puro (Mortazavi *et al.*, 2012).

Se, por um lado, a desidratação da dentina através da técnica de concentrações crescentes tem-se revelado menos sensível, por outro, esta requer diversas concentrações de etanol (50%, 70%, 80%, 95% e 100%), e um tempo de aplicação que varia entre 4 e 10 minutos (Osorio *et al.*, 2010; Ayar, 2016), sendo, por isso, de difícil aplicação clínica (Araújo *et al.*, 2013; Ayar, 2016).

Por estas razões, procurou-se aplicar a mesma filosofia através de uma técnica simplificada, com menor número de materiais necessários e menor tempo consumido. A técnica consiste na desidratação química da rede de colagénio através da aplicação de etanol puro na dentina condicionada, mantendo-a sempre visivelmente húmida até ao passo seguinte da adesão (Huang *et al.*, 2011; Osorio *et al.*, 2010; Perdigão *et al.*, 2013).

É de salientar que as diretivas laboratoriais de aplicação desta técnica são ainda muito variáveis na literatura, nomeadamente no que refere a aspetos como: o tempo de aplicação do etanol, formas de aplicação e utilização ou não de *primers*.

No que respeita a formas de aplicação, podem ser:

1. Aplicação passiva:

- 1.1 Contabilizada: duas gotas (Mortazavi *et al.*, 2012; Shin *et al.*, 2009)

- 1.2 Não contabilizada:

- 1.2.1 Por meio de agulha (Yesilyurt *et al.*, 2015)/outros (Sauro *et al.*, 2010; Duan *et al.*, 2011; Huang *et al.*, 2011; Pei *et al.*, 2012; Araújo *et al.*, 2013; Khoroushi *et al.*, 2014; Manso *et al.*, 2014);

- 1.2.2 Imersão, em 2 mL (Hosaka *et al.*, 2009; Ekambaram *et al.*, 2014);

- 1.2.3 Lavagem contínua (Cadenaro *et al.*, 2009; Osorio *et al.*, 2010).

2. Aplicação ativa, com *micro-brush* (Guimarães *et al.*, 2012).

Em relação aos tempos de aplicação, estes variam de tal forma que podem ir de 15 segundos (Cadenaro *et al.*, 2009) a 5 minutos (Osorio *et al.*, 2010).

A utilização ou não de *primers* é outra variável muito volátil. Vários autores optam por não utilizar qualquer tipo de *primer* (Cadenaro *et al.*, 2009; Shin *et al.*, 2009; Duan *et al.*, 2011; Mortazavi *et al.*, 2012; Khoroushi *et al.*, 2014; Manso *et al.*, 2014). Quando se usa *primer*, ainda podemos encontrar várias formas na literatura:

1. *Primer* do sistema adesivo comercial (Guimarães *et al.*, 2012; Pei *et al.*, 2012);
2. *Primer* experimental hidrofóbico, feito a partir da diluição do adesivo em etanol puro (Hosaka *et al.*, 2009; Sauro *et al.*, 2010; Huang *et al.*, 2011; Pei *et al.*, 2012; Araújo *et al.*, 2013; Ekambaram *et al.*, 2014; Khun *et al.*, 2015).

A técnica de EWB permite a aplicação de adesivos mais hidrofóbicos e, como tal, é frequente encontrarem-se estudos *in vitro* nos quais são desenvolvidos adesivos experimentais à base de etanol e monómeros mais hidrofóbicos, sendo em menor número os estudos clínicos ou laboratoriais onde são aplicados adesivos comerciais. Esta técnica preconiza a utilização de etanol a 100%, o qual é difícil de encontrar no mercado dentário. Estes factos, de uma maneira ou de outra, comprometem a extrapolação de diretivas clínicas e dificultam a aplicação da técnica de forma mais correta e com uso de materiais disponíveis no dia-a-dia da prática clínica.

Alguns autores concluem que a técnica de EWBs apresenta resultados mais variáveis que a técnica de EWBp, após comparação de estudos laboratoriais às 24 horas, (Sadek *et al.*, 2008; Osorio *et al.*, 2010; Sauro *et al.*, 2010). Por outro lado, Ayar (2014) comparou ambos os protocolos de EWB num estudo laboratorial, concluindo que é possível obter forças de adesão comparáveis às da técnica de WWB com ambos os protocolos de EWB (EWBp e EWBs), às 24 horas. Este autor sugere, assim, que mesmo uma aplicação de etanol de apenas 20 segundos permite aplicar um adesivo hidrofóbico e obter forças de adesão comparáveis às da técnica de WWB, sendo este um protocolo clinicamente mais simples.

3. Os testes de microtração

O teste de microtração (μ TBS) é muito utilizado para testar forças de adesão. Foi introduzido em 1994 por Sano e seus colaboradores, utilizando espécimes com uma área de adesão de cerca de 1mm^2 (Sano *et al.*, 1994). O teste envolve a preparação dos dentes após os procedimentos adesivos, permitindo obter vários espécimes a partir do mesmo dente, com três formatos possível: palito, haltere e ampulheta (Ghassemieh, 2008). Embora esta preparação não deixe de representar um procedimento sensível e dispendioso em termos de tempo, compensa largamente na rentabilidade dos dentes testados, além de se verificar melhor distribuição de *stress* e melhor controlo de diferenças regionais (Van Meerbeek *et al.*, 2010). Comparativamente aos testes de microcisalhamento (μ SBS), os testes μ TBS apresentam ainda outra vantagem. Della Bona e van Noort, em 1995, compararam os testes μ TBS com os testes μ SBS, concluindo que estes últimos provocam *stresses* desfavoráveis nos espécimes, aconselhando, desta forma, os primeiros.

A preparação dos dentes em espécimes com formato de palito apresenta vantagens quando comparada com os formatos de ampulheta e haltere, nomeadamente a facilidade de preparação e menor sensibilidade de técnica. Uma preparação menos cuidada de palitos em formato de haltere ou ampulheta pode resultar em defeitos na interface que podem provocam falhas prematuras (Van Meerbeek *et al.*, 2010). Dos três formatos, o palito é aquele que apresenta menor localização da concentração de *stress*, durante os testes μ TBS (Ghassemieh, 2008). Reconhecem-se ainda outros fatores que influenciam a concentração de *stress* e as forças de adesão, nomeadamente: a espessura do adesivo, desalinhamento do espécime no *jig* de Geraldelli e velocidade de aumento da carga durante o teste (Ghassemieh, 2008; Van Meerbeek *et al.*, 2010).

Colocam-se algumas questões aquando da utilização de testes μ TBS. A primeira prende-se com o número mínimo de dentes necessários para validar os resultados. Embora não exista consenso, cinco dentes é o número mínimo aceitável, de forma a garantir a vantagem da rentabilidade dos testes μ TBS (Van Meerbeek *et al.*, 2010). A segunda prende-se com a forma como se lida com as falhas de palitos pré-teste. A sua exclusão da análise estatística está desaconselhada, bem como a sua inclusão com força de adesão equivalente a zero. À semelhança do que fizeram autores como Luque-Martinez e colegas (2014), aconselha-se a sua inclusão na análise estatística com um valor pré-determinado, com base, por exemplo, no palito com o valor de μ TBS mais baixo, dentro de cada espécime (Van Meerbeek *et al.*, 2010).

4. Objetivos

O presente estudo tem como principais objetivos avaliar a influência de um novo protocolo da técnica de EWBs, com etanol a 96%, comparativamente com a técnica WWB nos testes de microtração às 24 horas; e de comparar a influência de dois tempos de aplicação de etanol a 96% (30 e 60 segundos) através de um novo protocolo da técnica de EWBs na resistência a microtração às 24 horas.

A primeira hipótese nula é que aplicação de adesivo comercial Adper Scotchbond[®] Multi-purpose (3M) com *primer* experimental hidrofóbico pela técnica de EWBs (etanol a 96%) não apresenta diferenças estatisticamente significativas nos testes μ TBS às 24 horas, comparativamente com a aplicação do mesmo sistema adesivo pela técnica de WWB. A segunda hipótese nula é que não existem diferenças significativas nos testes μ TBS às 24 horas entre a aplicação de etanol a 96% durante 30 e 60 segundos, através da técnica de EWBs.

III. Materiais e métodos

1. Tipo de estudo

Estudo experimental *in vitro* da influência da técnica de EWBs comparativamente à técnica WWB, e de dois tempos de aplicação de etanol a 96% na técnica de EWBs.

2. Desenho do estudo

No presente estudo foram utilizados quinze molares definitivos sem restaurações ou lesões de cárie clinicamente diagnosticáveis, os quais foram armazenados em Cloramina T a 0,5% (Sigma Chemical Co., St Louis, MO, USA), por uma semana, a 4°C, de acordo com a norma ISO/TS 11405:2003. Aos 15 dentes foram removidos todos resíduos de sangue e tecidos aderentes com uma cureta periodontal, em água corrente, e foram, posteriormente, distribuídos de forma aleatória pelos 3 grupos de estudo:

Grupo 1: *Water-wet bonding*

Grupo 2: *Ethanol-wet bonding* simplificado, com etanol a 96% aplicado durante 30s

Grupo 3: *Ethanol-wet bonding* simplificado, com etanol a 96% aplicado durante 60s

3. Preparação dos espécimes e procedimentos adesivos e restauradores

As coroas dos dentes foram unidas a suportes acrílicos com cera colante, perpendicularmente ao maior eixo do dente:

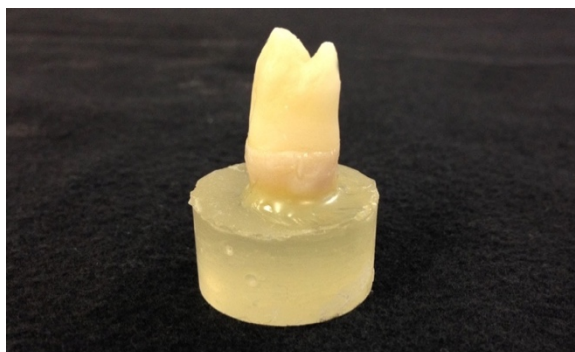


Fig. 1 – Dente montado num suporte de acrílico com cera colante.

Cortaram-se as raízes 2 mm abaixo da junção amelocementária com um disco diamantado (Diamond Wafering Blade - 10,2cm x 0,3mm - Series 15HC, Buehler Ltd., Lake Bluff, IL, USA), num micrótomo de tecidos duros (IsoMet® 1000 Precision Saw, Buehler Ltd., Lake Buff, IL, USA), a 250rpm, sob refrigeração constante com água.

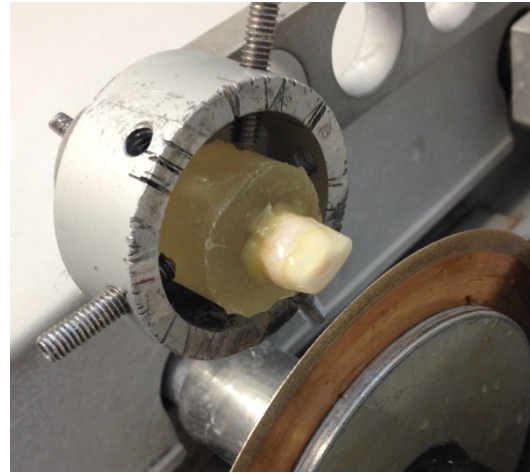
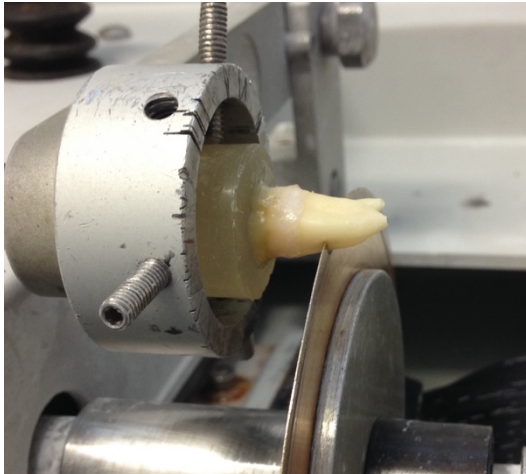


Fig. 2 e 3 – Corte das raízes num micrótomo, cerca de 2 mm abaixo da junção amelocementária, com exposição da câmara pulpar.

Procedeu-se à remoção dos tecidos pulpares da câmara pulpar com uma cureta de dentina. Preencheu-se a câmara pulpar com cola de cianoacrilato (Loctite Super Cola 3 Precisão, lote 1576681, Henkel Corp., Germany), e fixou-se a coroa pela superfície de corte e com a mesma cola ao suporte de acrílico.

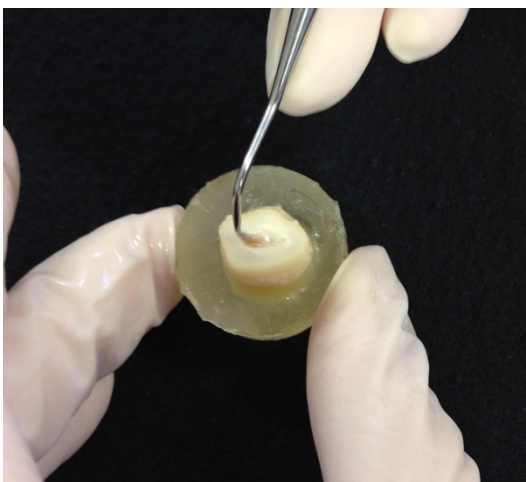


Fig. 4 – Remoção dos restos pulpares.



Fig. 5 – Preenchimento da câmara pulpar com cola de cianoacrilato.

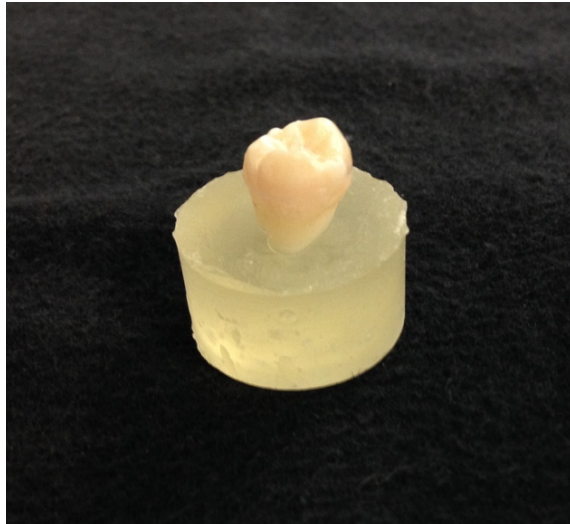


Fig. 6 – Fixação do remanescente dentário ao suporte acrílico, com cola de cianoacrilato.

Com o mesmo disco diamantado e micrótomo de tecidos duros, realizou-se um novo corte, a 250rpm, sob refrigeração constante com água, perpendicular ao longo eixo do dente, para remoção do esmalte coronal e dentina superficial, e de modo a expor dentina média.

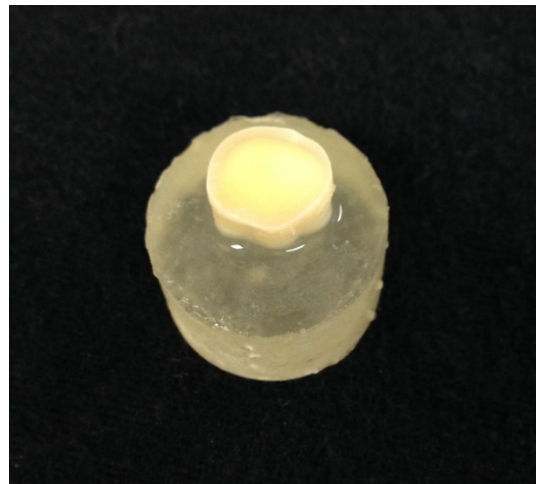
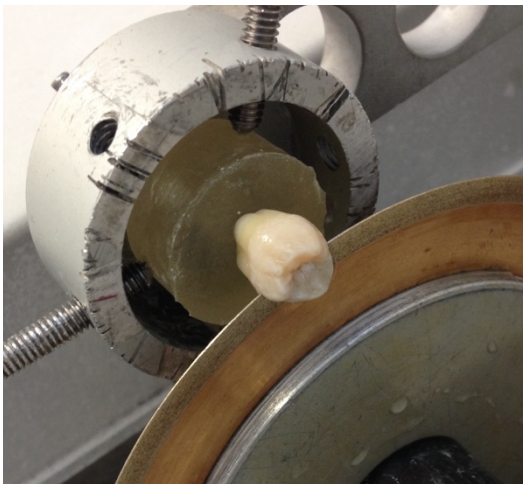


Fig. 7 e 8 – Corte do esmalte e dentina superficial com disco diamantado para exposição da dentina média.

Para simulação de *smear layer*, foi feito polimento da superfície dentinária com papel de carbureto de silício (SiC), de grão 600 (CarbiMet[®], Buehler Ltd., Lake Bluff, IL, USA) durante 60 segundos, sob irrigação com água, numa máquina polidora (DAP-U, Struers, Denmark). Posteriormente, cada espécime foi lavado com água destilada.

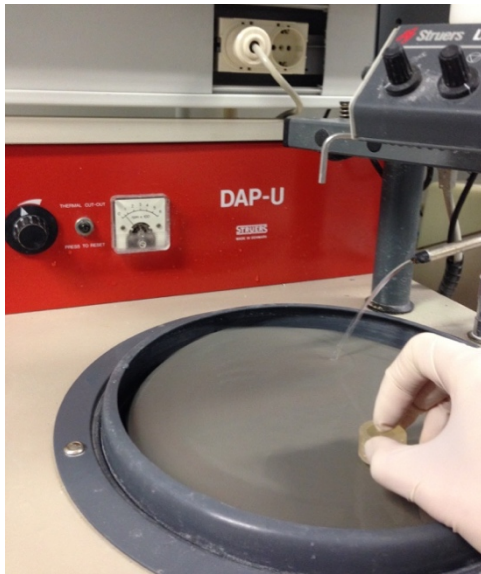


Fig. 9 – Máquina polidora.



Fig. 10 – Normalização da *smear layer* com disco de papel SiC de grão 600.

Procedeu-se ao condicionamento ácido dos dentes, com ácido ortofosfórico a 35% do sistema adesivo Adper Scotchbond® Multi-purpose (3M ESPE, St. Paul, MN, USA), à temperatura ambiente (15-20°C), durante 15 segundos, aplicado com a seringa de aplicação, seguindo-se uma lavagem contínua com água, durante 15 segundos e uniformização da humidade da superfície com bola de algodão húmida.

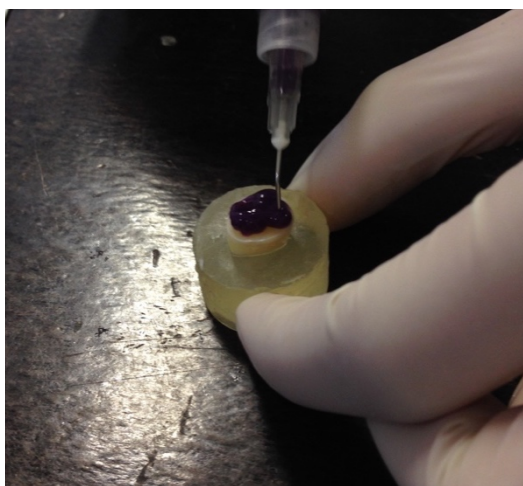


Fig. 11 – Condicionamento ácido da amostra.



Fig. 12 – Dentina húmida, após lavagem do ácido ortofosfórico.

Grupo 1: utilizou-se o sistema adesivo de 3 passos Adper Scotchbond® Multi-purpose (3M ESPE, St. Paul, MN, USA), de acordo com as instruções do fabricante. Aplicou-se o *primer*, com *micro-brush*, durante 30 segundos, seguindo-se de uma secagem com seringa de ar até a superfície se encontrar brilhante e não móvel. Aplicou-se uma segunda camada de *primer* em todos os espécimes deste grupo, uma vez que a superfície não se encontrava brilhante (Cavalheiro *et al.*, 2006), e secou-se.

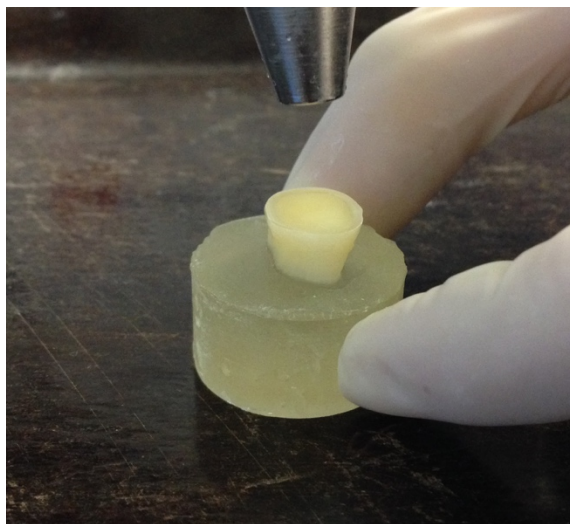


Fig. 13 – Secagem do *primer* após a sua aplicação com *micro-brush*.

Aplicou-se uma fina camada de adesivo com *micro-brush*, removendo os excessos com o *micro-brush*. Fotopolimerizou-se durante 20 segundos com fotopolimerizador (Bluephase® 20i, série 506160, Ivoclar Vivadent, Liechtenatein, Austria).

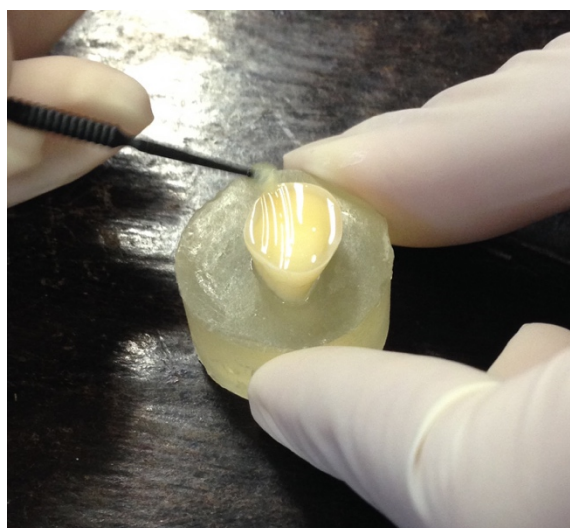


Fig. 14 – Aplicação do adesivo.

Grupos 2 e 3: a superfície de cada espécime foi tratada com aplicações de etanol a 96% (Continente, União Europeia) com *micro-brush*, durante 30 (no Grupo 2) ou 60 segundos (no Grupo 3), mantendo a superfície visivelmente húmida. Posteriormente, removeu-se o excesso de etanol com papel absorvente, mas manteve-se a superfície visivelmente húmida.

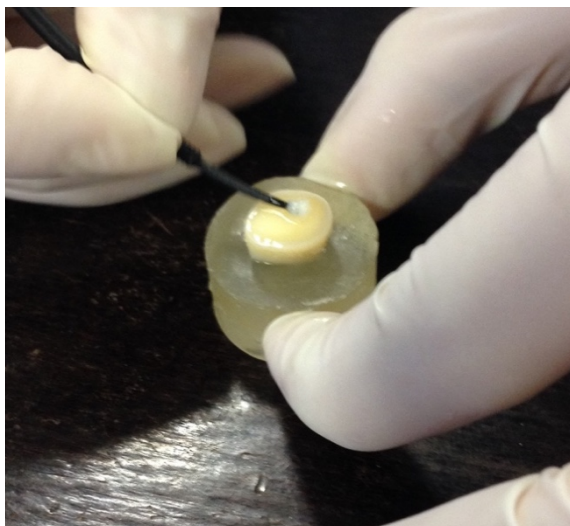


Fig. 15 – Aplicação de etanol com *micro-brush*.

Aplicou-se um *primer* experimental hidrofóbico com *micro-brush* durante 30 segundos. O *primer* experimental hidrofóbico foi conseguido a partir da mistura de etanol a 96% com o adesivo do sistema adesivo Adper Scotchbond® Multi-purpose (3M ESPE, St. Paul, MN, USA), de modo a obter uma solução com partes iguais de etanol a 96% e adesivo (50-50%).

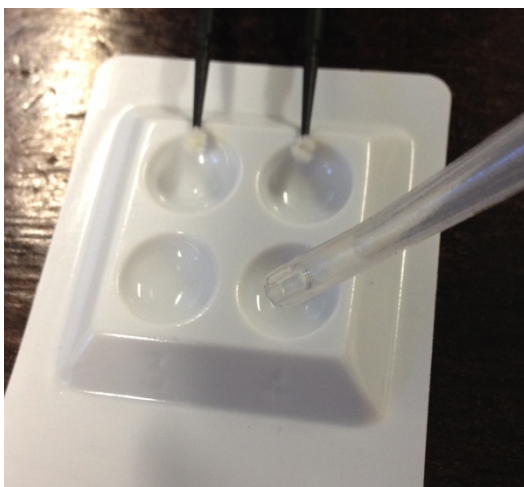


Fig. 16 – Pipetagem de uma gota de etanol.

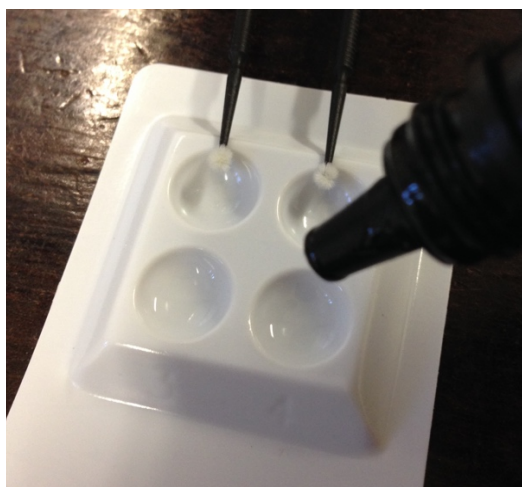


Fig. 17 – Aplicação de uma gota de adesivo para mistura com a gota de etanol a 96%.

Procedeu-se à secagem do *primer* com seringa de ar até a superfície se encontrar brilhante e não móvel. Aplicou-se uma fina camada do adesivo do sistema adesivo Adper Scotchbond® Multi-purpose (3M ESPE, St. Paul, MN, USA), com *micro-brush*, removendo os excessos com o próprio *micro-brush*. Fotopolimerizou-se o adesivo durante 20 segundos.

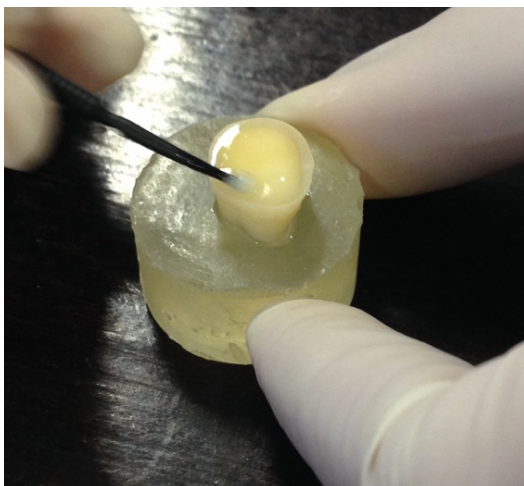


Fig. 18 – Aplicação do *primer* experimental.

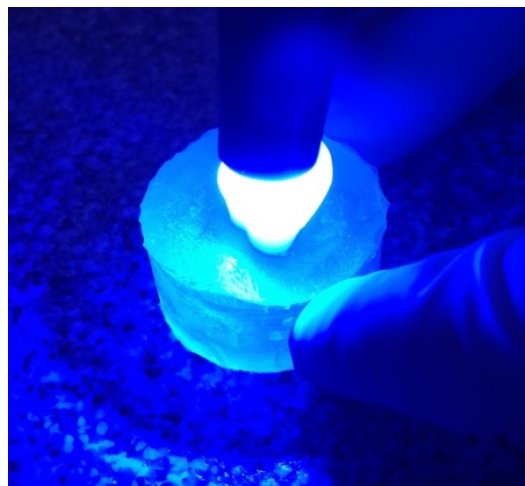


Fig. 19 – Fotopolimerização do adesivo.

Todos os espécimes foram restaurados com três incrementos de resina composta (Herculite® XVR Ultra Dentine A2, Kerr, Scafati, Italy) de 2 mm cada, com fotopolimerização de 40 segundos entre cada incremento. A intensidade do fotopolimerizador foi controlada frequentemente com um radiômetro (Bluephase® meter, série 001390, Ivoclar Vivadent, Liechtenatein, Austria).

Os protocolos adesivos dos três grupos podem ser consultados no Anexo 1.



Fig. 20 – Restauração por incrementos.

As coroas foram pintadas com tinta resistente a água (de modo a identificar os palitos mais externos nos quais a adesão foi feita a esmalte e, assim, poder descartá-los do estudo). Os espécimes foram mantidos em água destilada, numa estufa (TK/L 4105, EHRET GmbH & CO. KG, Germany), a 37°C, durante 24 horas e registou-se o dia e a hora da reconstrução e da colocação na estufa.



Fig. 21 – Reconstrução com cerca de 6 mm de altura pintada com tinta resistente a água.

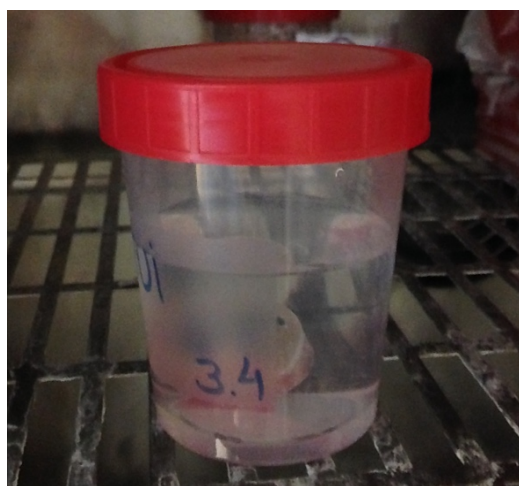


Fig. 22 – Armazenamento das amostras na estufa.

Produto	Fabricante e lote	Composição	Validade
Adper Scotchbond® Multi-purpose	3M ESPE, N547524	BisGMA Polímero ácido polialquenóico HEMA Aminas terciárias Fotoiniciador	01-2017
Herculite® XVR Ultra Dentine A2	Kerr, 5629580	Bisfenol-A-dimetacrilato etoxilado 2,2-Etilenedioxidietil dimetacrilato 3- Metacriloxipropiltrimetoxisilano BisGMA	05-2018
Álcool 96% Vol.	Continente, 15001130	Álcool etílico (96%) Cetrimida (0,25-0,30%)	12-2020

Tabela 1 – Produtos utilizados no estudo, e respetivos fabricantes, lotes, composições e validades.

4. Preparação para os testes de microtração

Procedeu-se à secção longitudinal nos eixos *x* e *y*, com disco diamantado a 250rpm (Diamond Wafering Blade - 10,2cm x 0,3mm - Series 15HC, Buehler Ltd., Lake Bluff, IL, USA), num micrótopo de tecidos duros (IsoMet® 1000 Precision Saw, Buehler Ltd., Lake Buff, IL, USA), sob irrigação constante com água destilada, de modo a obter palitos com uma área aproximada de 0,8mm².

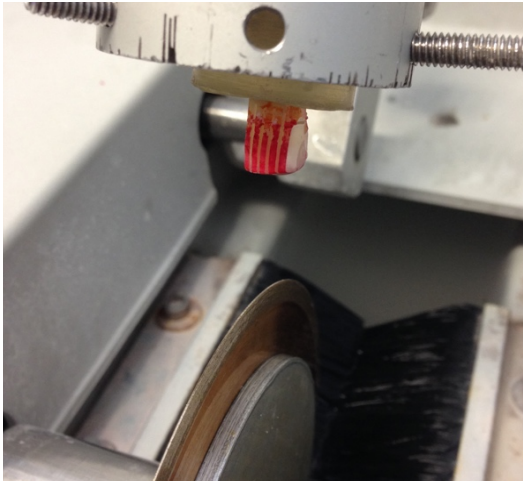


Fig. 23 – Corte do espécime no eixo do *x*.

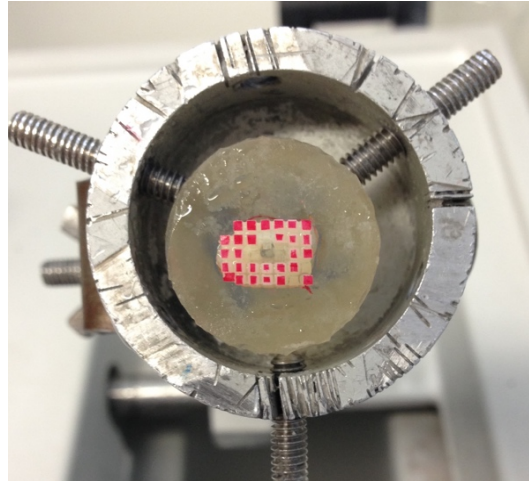


Fig. 24 – Espécime cortado nos eixos do *x* e do *y*.

Realizou-se um corte final na base da coroa, perpendicular ao eixo do dente, de modo a separar os palitos do suporte de acrílico. Registaram-se os palitos que fraturaram na interface do adesivo durante esta preparação.

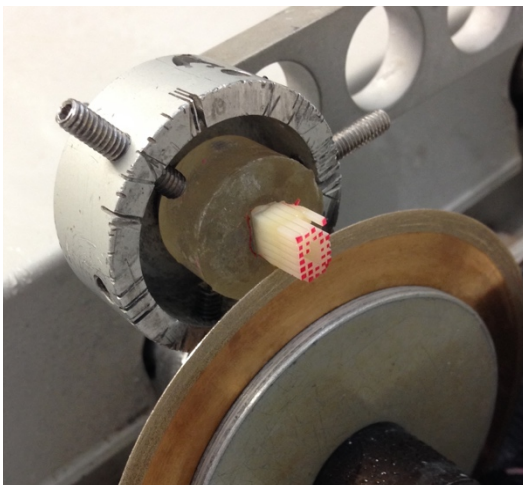


Fig. 25 – Corte para separar os palitos do suporte de acrílico.



Fig. 26 – Palitos obtidos após o corte.

A caracterização dos palitos obtidos, por grupo e por dente, pode ser consultada na tabela 1. Palitos que se separaram na interface adesiva durante o corte dos palitos foram classificados como palitos descolados, e posteriormente considerados na análise estatística. Consideraram-se palitos perdidos todos aqueles que se fraturaram ou perderam durante a preparação para os testes, ou cujo valor de MPa foi inferior a 2 (falha na manipulação).

Grupo	Dente	Palitos obtidos	Palitos descolados	Palitos perdidos	Palitos tracionados	Palitos testados por grupo
1	1.1	25	9	2	14	111
	1.2	32	6	2	24	
	1.3	34	1	0	33	
	1.4	32	5	2	25	
	1.5	26	8	3	15	
2	2.1	24	6	2	16	94
	2.2	24	6	0	18	
	2.3	29	5	1	23	
	2.4	24	4	0	20	
	2.5	23	6	0	17	
3	3.1	33	4	2	27	120
	3.2	32	3	3	26	
	3.3	31	1	1	29	
	3.4	29	2	1	26	
	3.5	25	11	2	12	
Total		423	77	21	325	

Tabela 2 – Caracterização dos palitos obtidos, por grupo e por dente.

5. Testes de microtração

Os testes de μ TBS foram sempre realizados imediatamente após o corte dos palitos. Procedeu-se à colagem de cada palito com cola cianoacrilato (737 Black Magic Toughened Adhesive, Permabond, Hampshire, UK) a cada uma das metades de um *jig* de Geraldelli, com o cuidado de deixar a interface livre de cola e na região de separação das duas metades do *jig*, com a orientação paralela à da força a ser exercida durante o teste. Submeteu-se cada palito a uma carga de tensão com máquina de teste universal (Instron 4502 Series, Serial no. H3307, Instron Corporation, Canton, MA, USA), à velocidade de 1mm/min, até à fratura, tendo-se registado o valor da força no momento da fratura.



Fig. 27 – Palito colado a um *jig* de Geraldelli.

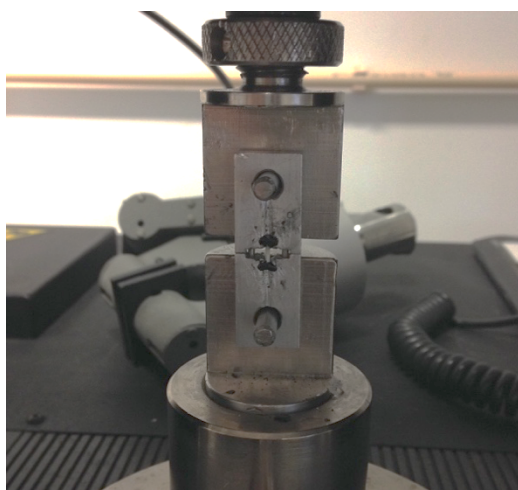


Fig. 28 – Palito colado a um *jig* de Geraldelli, durante o teste de microtração.

Observou-se os fragmentos do palito num estereomicroscópio (Nikon, Japan), a uma ampliação de 10x, e classificou-se o tipo de fratura de acordo com a zona do palito onde esta ocorreu. Fraturas apenas na interface adesiva foram classificadas como fraturas adesivas; fraturas somente em dentina ou somente em compósito foram classificadas como coesivas em dentina ou coesivas em compósito, respetivamente; e fraturas com compósito e dentina na interface foram registadas como fraturas mistas. Por fim, mediu-se ambos os lados de cada palito, com craveira digital (Absolute AOS Digimatic CD-15APX, Mitutoyo Corporation, Japan) para cálculo da área do mesmo. A área de cada palito e a sua resistência à fratura, medida em KiloNewtons (KN), foram registadas e, a partir delas, calculadas as forças de adesão em MegaPascais (MPa).



Fig. 29 – Medição da secção de um palito fraturado com craveira.

A data recording sheet titled 'TESTE DE MICRO-TRACÇÃO' with handwritten notes and a table of results. A pen is resting on the sheet.

Investigação: *Ethanol-Wet Bonding*

Tipo de fratura	Largura	Largura	Área	Força	MPa
<i>ED</i>	<i>0,71</i>	<i>0,76</i>		<i>0,0251</i>	
<i>A</i>	<i>0,81</i>	<i>0,92</i>		<i>0,0450</i>	
<i>CC</i>	<i>0,77</i>	<i>0,76</i>		<i>0,0242</i>	

Fig. 30 – Registo da secção, da força em KiloNewtons e do tipo de fratura.

6. Análise estatística

Os dados foram inseridos numa base de dados e analisados estatisticamente com auxílio do *software* para computador SPSS, versão 21.0 para o sistema operativo Windows (SPSS Inc. Chicago, IL 60606, USA).

A avaliação das diferenças estatísticas entre cada grupo foi realizada através de um teste Kruskal-Wallis. A normalidade dos resultados foi testada com Shapiro-Wilk. A avaliação das diferenças entre grupos foi avaliada com Oneway ANOVA.

Significância estatística foi estabelecida para 0,05.

IV. Resultados

De um modo geral, a Tabela 3 e o Gráfico 1 apresentam a quantidade dos vários tipos de fraturas obtidas em cada grupo. Verifica-se que a maioria dos espécimes apresentou fratura adesiva (72,89%). As fraturas mistas (7,71%) e coesivas em dentina (8,7%) apresentaram valores próximos. As fraturas coesivas em compósito apresentaram uma percentagem de 10,7%.

Grupo	Tipo de fratura			
	Adesiva	Mista	Coesiva em compósito	Coesiva em dentina
Grupo 1 (WWB)	99	14	18	9
Grupo 2 (EWBs, 30s)	90	13	12	6
Grupo 3 (EWBs, 60s)	104	4	13	20
Total	293	31	43	35

Tabela 3 – Quantidade dos vários tipos de fraturas obtidas em cada grupo.

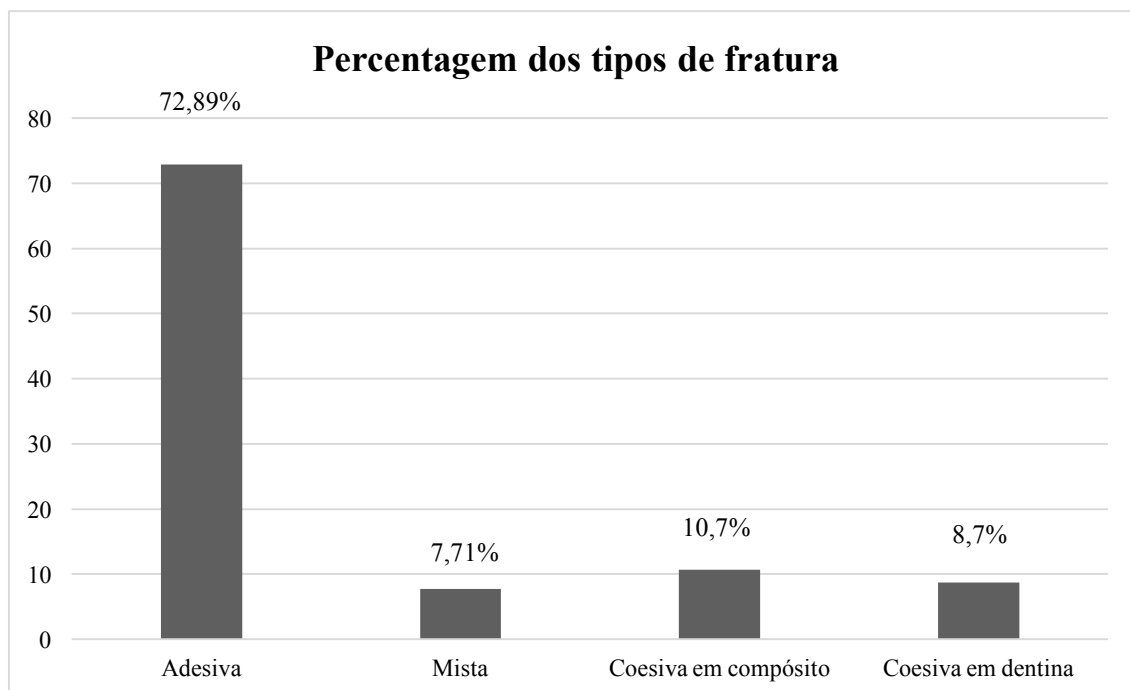


Gráfico 1 – Percentagem dos vários tipos de fratura no total de todos os grupos.

Através do teste Kruskal-Wallis verificou-se que não existem diferenças estatisticamente significativas entre cada grupo ($p=0,712$). A normalidade da amostra foi comprovada pelo teste Shapiro-Wilk, verificando-se um valor de p superior a 0,05 nos três grupos (Tabela 3).

Grupo	Shapiro-Wilk		
	Statistic	df	Sig.
MPa Grupo 1 (WWB)	,932	5	,612
Grupo 2 (EWBs, 30s)	,940	5	,663
Grupo 3 (EWBs, 60s)	,882	5	,319

Tabela 4 – Teste de normalidade de Shapiro-Wilk.

A homogeneidade da variância foi comprovada pelo Teste de Levène, verificando-se um valor de p superior a 0,05.

Levène Statistic	df1	df2	Sig.
1,620	2	12	,238

Tabela 5 – Teste de homogeneidade da variância de Levène.

Desta forma, preenchem-se os critérios necessários para aplicação do teste ANOVA. Todas as fraturas adesivas (palitos descolados) pré-teste foram incluídas na análise estatística, com metade do valor mínimo de MPa obtido durante os testes de microtração aos palitos dos três grupos (Luque-Martinez *et al.*, 2014). Deste modo, a todas as falhas adesivas pré-teste foi atribuído o valor de MPa de 1,914351.

A estatística descritiva da amostra encontra-se representada na Tabela 4. Os valores médios de MPa foram superiores no Grupo 3, seguindo o Grupo 1 e, por último, o Grupo 2.

Grupo	N	Média	Desvio-padrão	Mínimo	Máximo
1 (WWB)	5	25,6570	5,36309	19,50	34,13
2 (EWBs, 30s)	5	23,3294	4,45308	16,38	27,88
3 (EWBs, 60s)	5	30,1958	11,49067	11,96	40,23
Total	15	26,3941	7,76648	11,96	40,23

Tabela 6 – Médias e desvio padrão das forças de microtração (MPa), por grupo.

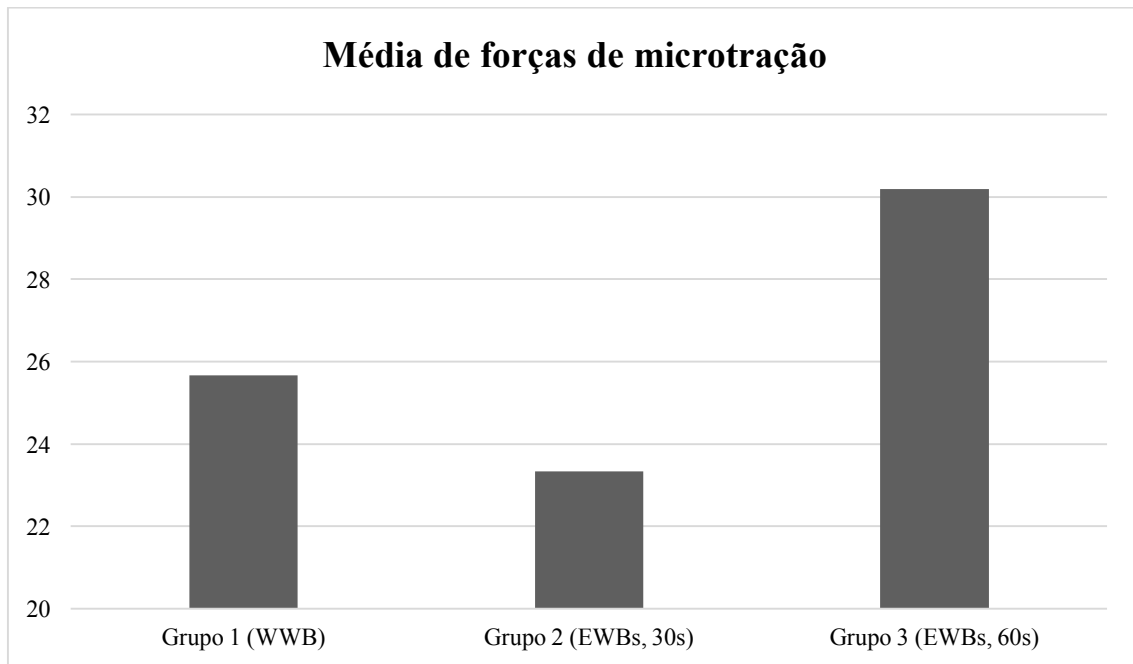


Gráfico 2 – Médias das forças de microtração (MPa), por grupo.

Através deste teste, foi possível verificar que não existem diferenças estatísticas entre os três grupos de estudo ($p=0,392$).

V. Discussão

Dada a dificuldade da aplicação da técnica de EWBp e dos resultados ainda pouco coerentes da técnica de EWBs, EWB continua a pertencer mais ao domínio da filosofia que da técnica. Esta filosofia procura desidratar quimicamente o colagénio dentinário após o condicionamento ácido, tendo como objetivo último responder aos desafios atuais da técnica de WWB.

No presente estudo procurou-se aplicar a técnica de EWBs com adesivos comerciais, fazendo uso de materiais acessíveis e económicos, e com um dispêndio de tempo e custos clinicamente mais aceitáveis que os da técnica de EWBp. Para tal, foi feita uma pesquisa prévia e avaliação dos protocolos semelhantes existentes na literatura, a fim de estruturar corretamente o estudo. No entanto, foram tomadas decisões diferentes das encontradas na literatura, de modo a cumprir os objetivos anteriormente referidos. Contrariamente a todos os estudos com EWBs, aplicou-se etanol a 96% em vez de a 100%, por uma questão de facilidade de acesso a este composto – uma vantagem para quem procure aplicar a técnica a nível clínico.

Uma vez que a literatura não é clara no que toca ao tempo de aplicação do etanol com melhores resultados na técnica de EWBs, decidiu-se estudar essa variável. Assim, planeou-se aplicar o etanol a 96% durante 60 segundos precisamente por ser o tempo de aplicação mais referenciado na literatura (Hosaka *et al.*, 2009; Osorio *et al.*, 2010; Mortazavi *et al.*, 2012). Além disso, Sauro e colegas concluíram que aplicações de etanol a 100% durante 1 e 5 minutos produzem efeitos semelhantes (Sauro *et al.*, 2010), ou seja, tempos de aplicação acima de 60 segundos parecem não ser vantajosos. De forma a procurar um protocolo menos moroso que o dos 60 segundos, decidiu-se compará-lo com a aplicação de etanol a 96% durante 30 segundos, definindo-se assim as duas variáveis em estudo.

Aplicou-se um *primer* experimental à base de adesivo diluído em etanol a 96% para evitar aplicar o *primer* do sistema adesivo Adper Scotchbond® Multi-purpose. Sendo este uma mistura de água, HEMA e polímero de ácido polialquenóico, a desidratação química prévia da dentina com etanol poderá ser um contrassenso caso este *primer* seja aplicado com a técnica de EWB, pois aplicar-se-á um *primer* à base de água em dentina desidratada, e possivelmente não se explorará a vantagem da técnica de EWB, que permite evitar monómeros mais hidrofílicos, como o HEMA.

Também contrariamente a grande parte dos estudos laboratoriais avaliados, em vez de 20 segundos, optou-se por polimerizações de 40 segundos entre incrementos de compósito, para evitar um maior número de fraturas coesivas em compósito nos testes de μ TBS (Perdigão *et al.*, 2006; Proença *et al.*, 2007).

Através deste estudo verificou-se que não existem diferenças estatisticamente significativas entre a aplicação da técnica de EWBs com etanol a 96% e a técnica de WWB, nos testes de microtração às 24 horas. Verificou-se também que não existem diferenças estatisticamente significativas entre a aplicação de etanol a 96% durante 30 ou 60 segundos, pela técnica de EWBs, nos testes de microtração às 24 horas. Desta forma, ambas as hipóteses nulas devem ser aceites.

Embora se verifiquem diferenças entre os protocolos encontrados na literatura, os resultados do presente estudo estão de acordo com vários estudos no que diz respeito à inexistência de diferenças estatisticamente significativas entre a aplicação de EWBs e WWB a substrato dentinário, às 24 horas (Hosaka *et al.*, 2009; Guimarães *et al.*, 2012; Ekambaram *et al.*, 2014; Manso *et al.*, 2014; Yesilyurt *et al.*, 2015). Relativamente a estudos semelhantes que fazem uso de adesivos comerciais de três passos de renome, como os sistemas *etch-and-rinse* Adper Scotchbond® Multi-purpose ou OptiBond FL, é possível destacar o trabalho de Guimarães e seus colegas, em 2012. À semelhança do presente estudo, estes autores aplicaram o sistema adesivo de 3 passos Adper Scotchbond® Multi-purpose com a técnica de EWBs (aplicação de etanol a 100% durante 30 segundos), e concluíram que não existem diferenças estatisticamente significativas às 24 horas, em comparação com os resultados obtidos pela aplicação do mesmo adesivo pela técnica de WWB (Guimarães *et al.*, 2012). Outros autores optaram por utilizar outros sistemas adesivos, comerciais (Yesilyurt *et al.*, 2015; Manso *et al.*, 2014) ou experimentais (Hosaka *et al.*, 2009; Ekambaram *et al.*, 2014), chegando aos mesmos resultados. A inexistência de diferenças estatisticamente significativas entre EWBs e WWB às 24 horas, quer para o sistema adesivo Adper Scotchbond® Multi-purpose, quer para os demais sistemas adesivos, pode residir no facto de a saturação da dentina em etanol aproximar o valor do parâmetro de solubilidade de Hoy para as forças polares da matriz de colagénio ao valor do mesmo parâmetro das resinas solvas em etanol (Nishitani *et al.*, 2006). Pensa-se que esta aproximação pode melhorar o *wetting* das fibras de colagénio e a penetração das resinas (Barton, 1991). Pensa-se ainda que as resinas mais hidrofílicas apresentam, em geral, forças de adesão superiores a curto prazo (Nishitani *et*

al., 2006). Embora no estudo atual se tenha utilizado um adesivo mais hidrofóbico, em cuja constituição não entra qualquer solvente, e de não se ter utilizado o *primer* do sistema adesivo Adper Scotchbond® Multi-purpose (ao contrário de Guimarães *et al.*, 2012), utilizou-se um *primer* experimental hidrofóbico, feito a partir da diluição em partes iguais do adesivo em etanol a 96%. Especula-se que esta diluição pode ter sido essencial, de forma a solver a resina mais hidrofóbica e aproximar as suas forças polares das da dentina saturada em etanol, podendo ter facilitado a sua penetração na rede de colagénio e tornado as forças de adesão dos grupos de EWBs estatisticamente semelhantes às do grupo de WWB, onde foi aplicado o adesivo *gold standard* (Nishitani *et al.*, 2006). Não foi encontrado nenhum estudo que fizesse uso do sistema adesivo Adper Scotchbond® Multi-purpose pela técnica de EWBs e que chegasse a um resultado com diferenças estatisticamente significativas comparativamente à técnica de WWB.

Embora, uma vez mais, se verifiquem diferenças entre os protocolos, outros autores chegarem a resultados diferentes dos do presente estudo, tendo verificado uma diminuição estatisticamente significativa das forças de adesão nos grupos tratados com EWBs, comparativamente com WWB, às 24 horas (Osorio *et al.*, 2010; Huang *et al.*, 2011; Ayar, 2014). As diferenças estatisticamente significativas entre a aplicação de EWBs e WWB, às 24 horas, talvez possam ser justificadas pela sensibilidade da técnica, com uma substituição incompleta da água pelo etanol, o que, por sua vez, pode levar a uma infiltração deficiente das resinas hidrofóbicas (Huang *et al.*, 2011). Além disso, as redes de colagénio dentinário após a aplicação de etanol pela técnica de EWBs apresentam diferenças morfológicas importantes comparativamente à técnica de WWB (superfícies mais lisas/regulares, colapsadas, com diminuição acentuada da *nano-aspereza* e diâmetro fibrillar inferior), as quais podem eventualmente influenciar as forças de adesão após a aplicação de adesivos (Osorio *et al.*, 2010).

No que diz respeito à inexistência de diferenças significativas entre a aplicação de etanol a 96% durante 30 ou 60 segundos pela técnica de EWBs a substrato dentinário, às 24 horas, embora uma vez mais se verifiquem diferenças nos protocolos, os resultados do presente estudo estão de acordo com os de Ayar (2014). Ao comparar dois tempos de aplicação de etanol a 100% pela técnica de EWBs, este autor concluiu que o menor tempo de aplicação (20 segundos) não apresentou diferenças estatisticamente significativas em

comparação com o maior tempo de aplicação (60 segundos), à semelhança do presente estudo. A ausência de diferenças estatisticamente significativas entre os dois tempos de aplicação pode ser justificada pelo facto de se tratarem de estudos laboratoriais, onde não foi simulada a pressão pulpar e as variáveis foram meticulosamente controladas para evitar a contaminação da dentina por água, após a aplicação do etanol. Pensa-se que a simulação da pressão pulpar poderá ter um papel importante na avaliação da capacidade de desidratação da dentina pelo etanol (Ayar, 2014). É ainda importante destacar que, à semelhança do estudo de Ayar, o protocolo de EWBs com maior tempo de aplicação de etanol apresentou uma média de forças de adesão superior à do protocolo com menor tempo de aplicação. Esta diferença, embora não seja estatisticamente significativa em nenhum dos estudos, talvez possa ser atribuída a uma desidratação da dentina mais eficaz, com uma maior percentagem de água livre removida, quando o etanol é aplicado durante um maior período de tempo (Agee *et al.*, 2015), o que pode eventualmente facilitar a penetração da resina mais hidrofóbica na rede de colagénio (Barton, 1991). Se assim for, especula-se que esta diferença possa ser maior caso se permita o envelhecimento dos espécimes, devendo esta variável ser estudada futuramente.

No presente estudo *in vitro* obteve-se uma elevada percentagem de fraturas adesivas (72,89%), sendo este o tipo de fratura predominante, tal como esperado nos testes de μ TBS (Pashley *et al.*, 1995; Ghassemieh, 2008). Esta predominância de fraturas adesivas revela-se importante na interpretação dos resultados dos testes de microtração, uma vez que as fraturas coesivas em dentina e em compósito não são representativas das situações clínicas (Sano *et al.*, 1994).

Uma das limitações deste estudo prende-se com a existência de pouca literatura sobre o tema, o que dificultou a estruturação do próprio estudo laboratorial. Além disso, os protocolos que estão disponíveis na literatura não são coerentes, o que dificulta a comparação dos seus resultados com os do presente estudo.

Outra das limitações deste estudo prende-se com os testes de μ TBS, os quais foram feitos 24 horas após os procedimentos adesivos e restauradores, sem permitir o envelhecimento dos espécimes e possíveis alterações degenerativas na camada híbrida dos mesmos. Um dos grandes benefícios aparentes da técnica de EWB relaciona-se precisamente com a maior longevidade do sistema adesivo, por maior proteção das fibras

de colagénio e menor absorção de água (Huang *et al.*, 2011; Khoroushi *et al.*, 2014). Não permitindo o envelhecimento dos espécimes, o teste da técnica às 24 horas permite apenas provar o seu benefício a curto prazo. Estudos a longo prazo são, portanto, necessários para avaliar ambas as variáveis estudadas num espaço de tempo maior. Num campo teórico, é também possível sublinhar a vantagem de menor incorporação de monómeros mais hidrofílicos, como o HEMA, uma vez que o *primer* do sistema adesivo Adper Scotchbond® Multi-purpose foi substituído por um *primer* experimental mais hidrofóbico. Esta substituição poderá eventualmente influenciar a longevidade das forças de adesão.

Outra limitação deste estudo laboratorial prende-se com a escolha do próprio sistema adesivo, Adper Scotchbond® Multi-purpose, a qual foi feita dado o seu carácter de *gold standard*. Embora a percentagem de cada constituinte do adesivo seja desconhecida, sabe-se que na sua constituição entra também o monómero HEMA. Consoante esta percentagem, maior ou menor carácter hidrofílico da camada híbrida resultante é esperado, com repercussões a longo prazo que podem invalidar, de alguma forma, os benefícios da técnica. Assim, futuros estudos que procurem aplicar a técnica de EWB com adesivos comerciais devem fazê-lo com aqueles em cuja constituição não entre este monómero, ou qualquer outro mais hidrofílico.

Sugere-se o desenvolvimento de mais estudos laboratoriais, nos quais se avaliem os benefícios da técnica de EWBs, com vários tempos de aplicação de etanol, e a longo prazo.

VI. Conclusões

O presente estudo permite concluir que a aplicação de um novo protocolo simplificado da técnica de EWB, no qual são utilizados materiais acessíveis e económicos e com um dispêndio de tempo clinicamente aceitável, não apresenta diferenças estatisticamente significativas quando comparado com a aplicação da técnica de WWB com o sistema adesivo *gold standard* da adesão, o Adper Scotchbond® Multi-purpose.

Conclui-se ainda que aplicações de etanol a 96% de 30 e 60 segundos permitem obter forças de adesão estatisticamente semelhantes, nos testes de μ TBS às 24 horas.

Anexo 1

Protocolo adesivo do Grupo 1 – <i>Water-wet Bonding</i>
<ol style="list-style-type: none">1. Aplicação de gel de ácido ortofosfórico a 35% do sistema adesivo Adper Scotchbond® Multi-purpose, durante 15 segundos;2. Lavagem com água durante 15 segundos;3. Remoção do excesso de água com bola de algodão húmida;4. Aplicação do <i>primer</i> do sistema adesivo Adper Scotchbond® Multi-purpose, com <i>micro-brush</i> durante 30 segundos e secagem suave;5. Aplicação de segunda camada de <i>primer</i>;6. Secagem suave até a superfície se encontrar brilhante e não móvel;7. Aplicação de fina camada do adesivo Adper Scotchbond® Multi-purpose ao esmalte e à dentina, removendo os excessos com o <i>micro-brush</i> de aplicação;8. Fotopolimerização do adesivo durante 20 segundos.

Tabela 7 – Protocolo adesivo do Grupo 1.

Protocolo adesivo dos Grupo 2 e 3 – <i>Ethanol-wet Bonding</i>
<ol style="list-style-type: none">1. Aplicação de gel de ácido ortofosfórico a 35% do sistema adesivo Adper Scotchbond® Multi-purpose, durante 15 segundos;2. Lavagem com água durante 15 segundos;3. Remoção do excesso de água com bola de algodão húmida;4. Aplicações de etanol a 96% com <i>micro-brush</i>, durante 30 ou 60 segundos (Grupos 2 ou 3, respetivamente), mantendo a superfície visivelmente húmida;5. Remoção de excessos de etanol com papel absorvente, mantendo a superfície visivelmente húmida;6. Aplicação do <i>primer</i> experimental hidrofóbico (mistura de uma gota de etanol a 96% com uma gota do adesivo do sistema adesivo Adper Scotchbond® Multi-purpose), com <i>micro-brush</i> durante 30 segundos;7. Secagem suave até a superfície se encontrar brilhante e não móvel;8. Aplicação de fina camada do adesivo Adper Scotchbond® Multi-purpose, removendo os excessos com o <i>micro-brush</i> de aplicação;9. Fotopolimerização do adesivo durante 20 segundos.

Tabela 8 – Protocolo adesivo dos Grupos 2 e 3.

Bibliografia

- Agee KA, Prakki A, Abu-Haimed T, Naguib GH, Nawareg MA, Tezvergil-Mutluay A, Scheffel DLS, Chen C, Jang SS, Hwang H, Brackett M, Grégoire G, Tay FR, Breschi L, Pashley DH. Water distribution in dentin matrices: Bound vs. unbound water. *Dent Mater*. 2015 Mar;31(3):205-16
- Ahn J, Jung KH, Son SA, Hur B, Kwon YH, Park JK. Effect of additional etching and ethanol-wet bonding on the dentin bond strength of one-step self-etch adhesives. *Restor Dent Endod*. 2015 Feb;40(1):68-74
- Araújo JF, Barros TA, Braga EM, Loretto SC, Silva e Souza Pde A, Silva e Souza MH. One-year evaluation of a simplified ethanol-wet bonding technique: a randomized clinical trial. *Braz Dent J*. 2013;24(3):267-72
- Ayar MK. A review of ethanol wet-bonding: Principles and techniques. *Eur J Dent*. 2016 Jan-Mar;10(1):155-9
- Ayar MK. Ethanol application protocols and microtensile dentin bond strength of hydrophobic adhesive. *Tanta Dental Journal*. 2014 December; 11(3):206-12
- Ayar MK, Yesilyurt C, Alp CK, Yildirim T. Effect of ethanol-wet-bonding technique on resine-enamel bonds. *Journal of Dental Sciences*. 2014;9:16-22
- Barton AFM. Surfaces and interfaces. *CRC handbook of solubility parameters and other cohesion parameters*. Barton AFM, editor. 2nd ed. Boca Raton. CRC Press, Inc., 1991;583-629
- Breschi L, Mazzoni A, Ruggeri A, Cadenaro M, Lenarda RD, Dorigo EDS. Dental adhesion review: Aging and stability of the bonded interface. *Dent Mater*. 2008 Jan;24(1):90-101
- Cadenaro M, Breschi L, Rueggeberg FA, Agee K, Di Lenarda R, Carrilho M, Tay FR, Pashley DH. Effect of adhesive hydrophilicity and curing time on the permeability of resins bonded to water vs. ethanol-saturated acid-etched dentin. *Dent Mater*. 2009 Jan;25(1):39-47

- Cavalheiro A, Vargas MA, Armstrong SR, Dawson DV, Gratton DG (2006). Effect of incorrect primer application on dentin permeability. *J Adhes Dent* 8:393-400
- Chiba A, Zhou J, Nakajima M, Tan J, Tagami J, Scheffel DLS, Hebling J, Agee KA, Breschi L, Grégoire G, Jang SS, Tay FR, Pashley DH. The effects of ethanol on the size-exclusion characteristics of type I dentin collagen to adhesive resin monomers. *Acta Biomater*. 2016 Mar 15;33:235-41
- Della Bona A, van Noort R. Shear vs. tensile bond strength of resin composite bonded to ceramic. *J Dent Res*. 1995 Sep;74(9):1591-6
- Duan SS, Ouyang XB, Pei DD, Huo YH, Pan QH, Huang C. Effects of ethanol-wet bonding technique on root dentine adhesion. *Chin J Dent Res*. 2011;14(2):105-11.
- Ekambaram M, Yiu CKY, Matinlinna JP, King NM, Tay FR. Adjunctive application of chlorhexidine and ethanol-wet bonding on durability of bonds to sound and caries-affected dentine. *J Dent*. 2014 Jun;42(6):709-19
- Faria-e-Silva AL, Araújo JE, Rocha GP, de Oliveira Ada S, de Moraes RR. Solvent content and dentin bond strengths using water-wet, ethanol-wet and deproteinization bonding techniques. *Acta Odontol Scand*. 2013 May-Jul;71(3-4):710-5
- Ghassemieh E. Evaluation of sources of uncertainties in microtensile bond strength of dental adhesive system for different specimen geometries. *Dent Mater*. 2008 Apr;24(4):536-47
- Grégoire G, Sharrock P, Delannée M, Delisle MB. Depletion of water molecules during ethanol wet-bonding with etch and rinse dental adhesives *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*. 2013 Jan 1;33(1):21-7
- Guimarães LA, Almeida JC, Wang L, D'Alpino PH, Garcia FC. Effectiveness of immediate bonding of etch-and-rinse adhesives to simplified ethanol-saturated dentin. *Braz Oral Res*. 2012 Mar-Apr;26(2):177-82
- Hosaka K, Nishitani Y, Tagami J, Yoshiyama M, Brackett WW, Agee KA, Tay FR, Pashley DH. Durability of Resin-Dentin Bonds to Water- vs. Ethanol-saturated Dentin. *J Dent Res*. 2009;88(2):146-51

- Huang X, Li L, Huang C, Du X. Effect of ethanol-wet bonding with hydrophobic adhesive on caries-affected dentine. *Eur J Oral Sci.* 2011 Aug;119(4):310-5
- Ito S, Hashimoto M, Wadgaonkar B, Svizero N, Carvalho RM, Yiu C, Rueggeberg FA, Foulger S, Saito T, Nishitani Y, Yoshiyama M, Tay FR, Pashley DH. Effects of resin hydrophilicity on water sorption and changes in modulus of elasticity. *Biomaterials.* 2005 Nov;26(33):6449-59
- Jee SE, Zhou J, Tan J, Breschi L, Tay FR, Grégoire G, Pashley DH, Jang SS. Investigation of ethanol infiltration into demineralized dentin collagen fibrils using molecular dynamics simulations. *Acta Biomater.* 2016 May;36:175-85
- Khoroushi M, Rafizadeh M, Samimi P. Bond Strength of Composite Resin to Enamel: Assessment of Two Ethanol Wet-Bonding Techniques. *J Dent (Tehran).* 2014 Mar;11(2):150-60
- Kim J, Gu L, Breschi L, Tjäderhane L, Choi KK, Pashley DH, Tay FR. Implication of ethanol wet-bonding in hybrid layer remineralization. *J Dent Res.* 2010 Jun;89(6):575-80
- Kuhn E, Farhat P, Teitelbaum AP, Mena-Serrano A, Loguercio AD, Reis A, Pashley DH. Ethanol-wet bonding technique: Clinical versus laboratory findings. *Dent Mater.* 2015 Sep;31(9):1030-7
- Li H, Li T, Li X, Zhang Z, Li P, Li Z. Morphological effects of MMPs inhibitors on the dentin bonding. *Int J Clin Exp Med.* 2015 Jul 15;8(7):10793-803
- Liu Y, Tjäderhane L, Breschi L, Mazzoni A, Li N, Mao J, Pashley DH, Tay FR. Limitations in bonding to Dentin and Experimental Strategies to Prevent Bond Degradation. *J Dent Res.* 2011 Aug;90(8):953-68
- Luque-Martinez IV, Perdigão J, Muñoz MA, Sezinando A, Reis A, Loguercio AD. Effects of solvent evaporation time on immediate adhesive properties of universal adhesives to dentin. *Dent Mater.* 2014 Oct;30(10):1126-35
- Malacarne J, Carvalho RM, de Goes MF, Svizero N, Pashley DH, Tay FR, Yiu CK, Carrilho MR. Water sorption/solubility of dental adhesive resins. *Dent Mater.* 2006 Oct;22(10):973-80

- Manso AP, Grande RH, Bedran-Russo AK, Reis A, Loguercio AD, Pashley DH, Carvalho RM. Can 1% chlorhexidine diacetate and ethanol stabilize resin-dentin bonds?. *Dent Mater*. 2014 Jul;30(7):735-41
- Mortazavi V, Samimi P, Rafizadeh M, Kazemi S. A randomized clinical trial evaluating the success rate of ethanol wet bonding technique and two adhesives. *Dent Res J (Isfahan)*. 2012 Sep;9(5):588-94
- Nishitani Y, Yoshiyama M, Donnelly AM, Agee KA, Sword J, Tay FR, Pashley DH. Effects of resin hydrophilicity on dentin bond strength. *J Dent Res*. 2006 Nov;85(11):1016-21
- Osorio E, Toledano M, Aguilera FS, Tay FR, Osorio R. Ethanol wet-bonding technique sensitivity assessed by AFM. *J Dent Res*. 2010 Nov;89(11):1264-9
- Pashley DH, Sano H, Ciucchi B, Yoshiyama M, Carvalho RM. Adhesion testing of dentin bonding agents: a review. *Dent Mater*. 1995;11:117-25
- Pashley DH, Tay FR, Breschi L, Tjäderhane L, Carvalho RM, Carrilho M, Tezvergil-Mutluay A. State of the art etch-and-rinse adhesives. *Dent Mater*. 2011 Jan;27(1):1-16
- Pashley DH, Tay FR, Carvalho RM, Rueggeberg FA, Agee KA, Carrilho M, Donnelly A, García-Godoy F. From dry bonding to water-wet bonding to ethanol-wet bonding. A review of the interactions between dentin matrix and solvated resins using a macromodel of the hybrid layer. *Am J Dent*. 2007 Feb;20(1):7-20.
- Pei D, Huang X, Huang C, Wang Y, Ouyang X, Zhang J. Ethanol-wet bonding may improve root dentine bonding performance of hydrophobic adhesive. *J Dent*. 2012 May;40(5):433-41
- Perdigão J, Gomes G, Gondo R, Fundingsland JW. In vitro bonding performance of all-in-one adhesives. Part I - microtensile bond strengths. *J Adhes Dent*. 2006;8:367-73
- Perdigão J, Reis A, Loguercio AD. Dentin adhesion and MMPs: a comprehensive review. *J Esthet Restor Dent*. 2013 Aug;25(4):219-41

- Proença JP, Polido M, Osorio E, Erhardt MC, Aguilera FS, Garcia-Godoy F, Osorio R, Toledano M. Dentin regional bond strength of self-etch and total-etch adhesive systems. *Dent Mater*. 2007;23:1542-8
- Sadek FT, Braga RR, Muench A, Liu Y, Pashley DH, Tay FR. Ethanol wet-bonding challenges current anti-degradation strategy. *J Dent Res*. 2010 Dec;89(12):1499-504
- Sadek FT, Pashley DH, Nishitani Y, Carrilho MR, Donnelly A, Ferrari M, Tay FR. Application of hydrophobic resin adhesives to acid-etched dentin with an alternative wet bonding technique. *J Biomed Mater Res A*. 2008 Jan;84(1):19-29
- Sano H, Shono T, Sonoda H, Takatsu T, Ciucchi B, Carvalho R, Pashley DH. Relationship between surface area for adhesion and tensile bond strength--evaluation of a micro-tensile bond test. *Dent Mater*. 1994 Jul;10(4):236-40
- Sauro S, Toledano M, Aguilera FS, Mannocci F, Pashley DH, Tay FR, Watson TF, Osorio R. Resin-dentin bonds to EDTA-treated vs. acid-etched dentin using ethanol wet-bonding. *Dent Mater*. 2010 Apr;26(4):368-79
- Scheffel DL, Sacono NT, Ribeiro AP, Soares DG, Basso FG, Pashley D, Costa CA, Hebling J. Immediate human pulp response to ethanol-wet bonding technique. *J Dent*. 2015 May;43(5):537-45
- Sezinando A. Looking for the ideal adhesive – A review. *Rev Port Estomatol Med Dent Cir Maxilofac*. 2014;55(4):194-206
- Shin TP, Yao X, Huenergardt R, Walker MP, Wang Y. Morphological and chemical characterization of bonding hydrophobic adhesive to dentin using ethanol wet bonding technique. *Dent Mater*. 2009 Aug;25(8): 1050-7
- Tay FR, Pashley DH, Kapur RR, Carrilho MR, Hur YB, Garrett LV, Tay KC. Bonding BisGMA to dentin-a proof of concept for hydrophobic dentin bonding. *J Dent Res*. 2007 Nov;86(11):1034-9

- Van Meerbeek B, Peumans M, Poitevin A, Mine A, Van Ende A, Neves A, De Munck J. Relationship between bond-strength tests and clinical outcomes. *Dent Mater*. 2010 Feb;26(2):100-21
- Van Meerbeek B, Yoshihara K, Yoshida Y, Mine A, De Munck J, Van Landuyt KL. State of the art of self-etch adhesives. *Dent Mater*. 2011 Jan;27(1):17-28
- Yesilyurt C, Ayar MK, Yildirim T, Akdag MS. Effect of simplified ethanol-wet bonding on dentin bonding durability of etch-and-rinse adhesives. *Dent Mater J*. 2015;34(4):441-8
- Yiu CK, King NM, Pashley DH, Suh BI, Carvalho RM, Carrilho MR, Tay FR. Effect of resin hydrophilicity and water storage on resin strength. *Biomaterials*. 2004 Nov;25(26): 5789-96